

# 論文審査の結果の要旨

氏名 早野 元詞

本論文は、個体発生や、細胞の分化などの制御メカニズムとの関係が報告されてきている DNA 複製開始の場所やタイミングを決める「複製プログラム」を制御する因子の単離と、それらの機能解析に関するものである。Hsk1/Cdc7 は複製開始起点からの DNA 複製が開始される際に重要なリン酸化反応を行なう保存されたキナーゼである。申請者は、分裂酵母をもちいて、*hsk1-89* 温度感受性変異体や *hsk1* 欠損変異体の致死を抑圧する変異体を単離するという遺伝学的手法を用いて「複製プログラム」を制御する新規因子 *mrc1, rif1* を同定した。さらにこれらによる制御メカニズムについて解析を行った。

申請者は Mrc1 による制御メカニズムを解析するため、*mrc1* 欠損変異体や Mrc1 の DNA 複製チェックポイント変異である *mrc1-3A* 変異体における DNA 複製開始や複製フォークの進行を、2次元アガロース電気泳動法を用いて検討した。さらに Mrc1 や複製開始因子である Cdc45 のクロマチン免疫沈降法(ChIP)や、ゲノムワイドで結合部位を同定する ChIP-chip 法によって、Mrc1 は、MCM 複合体が結合した後、Cdc45 が結合する前に Hsk1 や Cdc45 非依存的に、初期複製開始起点に選択的に結合し、チェックポイント非依存的に Cdc45 の結合を阻害することで初期複製開始起点からの DNA 複製開始のタイミングを制御していることを明らかにした。さらに、この阻害的制御を Hsk1 が解除する可能性が考えられるが、実際に本論文において Mrc1 は DNA 複製が開始される時期に一過性に Hsk1 依存的にリン酸化されていることを示している。

一方、*hsk1* 欠損は *mrc1* 欠損によって致死性が抑圧されるが、*mrc1-3A* 変異体や、*cds1* 欠損変異体によっても *mrc1* 欠損は部分的ではあるが抑圧される。これは実際に、DNA 複製阻害剤である HU (ヒドロキシ尿素) 存在下での DNA 複製を、BrdU を取り込ませた細胞を用いて ChIP-chip で解析したところ、後期複製開始起点からの DNA 複製が *mrc1* 欠損及び、*cds1* 欠損変異体において弱く観察されると共に、これらの変異体におい

て Cdc45 と Mcm2 の相互作用が増加していることが示された。これらから、Mrc1 はチェックポイント依存的な経路によっても、後期複製開始起点からの DNA 複製開始を Cdc45 の MCM 複合体への結合を阻害することで制御していると結論した。

本論文では、新規な複製プログラム制御因子を単離するため、*hsk1* 欠損細胞の致死を抑制する因子のスクリーニングを行い、新たに 16 株単離し、1 つが *mrc1* であり、4 つが *rif1* という進化的に保存された新規因子であることを発見した。Rif1 は Taz1 や Rap1 と共にテロメア長の維持に必要な因子であることが報告されているが、*taz1* 欠損や *rap1* 欠損は *hsk1-89* 変異を抑制しないこと、*rif1* 欠損変異体が DNA 複製阻害剤や DNA 損傷への感受性がないことから、テロメア維持機能やチェックポイント非依存的に *hsk1* 欠損の致死を抑制していることが明らかとなった。実際に *rif1* 欠損変異体においてテロメア領域を含め、多くの後期複製開始起点からの DNA 複製が脱制御されていることが BrdU の ChIP-chip から示された。また Rif1 の ChIP 解析から、Rif1 は初期複製開始領域には結合しないが、後期複製開始起点の一部(ori4251)に M-G1 期に結合することから、Rif1 は複製開始前に複製開始起点の一部に結合し複製プログラムを制御している可能性が示唆された。同時に、*rif1* 欠損変異体では第 3 染色体のように初期複製開始活性の高い領域では一部の起点からの DNA 複製が抑制される。これらの結果から Rif1 は Mrc1 とは異なる機構で、DNA 複製プログラムを正および負に制御する因子であることが示された。本論文は、*hsk1* 変異体を用いることで「複製プログラム」を制御する因子を単離するという申請者独自の手法を用いており、遺伝的解析を元に、複製プログラムを制御する二個の新規因子を同定し、さらに 2 次元アガロース電気泳動や ChIP-chip 法などを用いてそれらによる制御機構の詳細に迫った優れた論文であり、博士論文として学位に値する内容であると判断する。今後、より詳細なタンパク質間相互作用なども含め、多くの解析が進むとともに、転写を含めた細胞内の機能との関連性についても解析が進むことが期待される。また、学位審査会における、早野元詞君の質疑応答の際の受け答えも、適切であり、学位に値する知識、学識を有していると判断された。

なお、本論文は、当研究室の松本清治、加納豊博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断

する。以上の理由により、早野元詞君に博士（生命科学）の学位を授与できると認める。